

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

A US 3748233

BEST AVAILABLE COPY

(51)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Int. Cl.:

C 12 d, 13/10

C 11 d, 7/42

DEUTSCHES



PATENTAMT

(52)

Deutsche Kl.:

6 a, 22/04

23 e, 2

(10)

(11)

(21)

(22)

(43)

Offenlegungsschrift 2044 161

Aktenzeichen: P 20 44 161.6

Anmeldetag: 5. September 1970

Offenlegungstag: 15. April 1971

Ausstellungspriorität: —

(30)

Unionspriorität

(32)

Datum: 8. September 1969

(33)

Land: V. St. v. Amerika

(31)

Aktenzeichen: 856182

(54)

Bezeichnung: Alkalische Protease und diese enthaltende Wasch- und Reinigungsmittel

(61)

Zusatz zu: —

(62)

Ausscheidung aus: —

(71)

Anmelder: Unilever N. V., Rotterdam (Niederlande)

Vertreter: Werth, A. van der, Dr.-Ing.; Lederer, F., Dipl.-Chem. Dr.; Patentanwälte, 2000 Hamburg und 8000 München

(72)

Als Erfinder benannt: Viccaro, John Peter, Jamaica, N. Y. (V. St. A.)

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBl. I S. 960): —

DT 2044 161

ORIGINAL INSPECTED

• 4.71 109 816/1835

11/80

2044161

Patentanwälte
Dr. Ing. A. van der Werth
Dr. F. Lederer
21 Hamburg 90
Wilstorfer Straße 32

4. Sep. 1970

UNILEVER N.V. Museumpark 1, Rotterdam/Holland

A l k a l i s c h e P r o t e a s e u n d d i e s e
e n t h a l t e n d e W a s c h - u n d R e i n i g u n g s -
m i t t e l .

Priorität: 8. September 1969, USA. Nr. 856 182

Die Erfindung betrifft eine alkalische Protease, erhalten als ein Wachstumsprodukt des Mikroorganismus Bacillus licheniformis ATCC No. 21424 in einem Nährstoffmedium, ein Verfahren zur Gewinnung der alkalischen Protease und diese Protease enthaltende Wasch- und Reinigungsmittel.

Alkalische Protease ist ein Ausdruck, welcher verwendet wird, um ein proteolytisches Enzym zu bezeichnen, welches eine optimale Aktivität in einem alkalischen Medium entfaltet. Derartige proteolytische Enzyme sind brauchbar als aktiver Bestandteil in modernen enzymhaltigen Wasch-, Reinigungs- und Einweichmitteln. Das Enzym wird angewendet wegen seines Vermögens, die üblichen Schmutzarten und Flecken anzugreifen und aus der Wäsche zu entfernen, welche zu einem erheblichen Teil aus Protein bestehen, wie z.B. Blut- und Grasflecken.

Eine Anzahl von Quellen für alkalische Protease sind zur Zeit bekannt. Einige der jetzt technisch verwendeten wichtigeren Proteasen stammen aus der Gärung von Bacillus subtilis und Bacillus licheniformis oder aus Schimmelpilzen, z.B. Aspergilli.

109816/1835

Ein Stamm von Bacillus licheniformis ATCC No.21424 wurde nun aufgefunden. Dieser Stamm liefert hohe Ausbeuten an alkalischer Protease, wenn der Organismus in Nährstoffmedien gezüchtet wird. Aussergewöhnliche Ergebnisse werden erhalten aus Medien, bestimmter Eigenschaften. Das erfindungsgemäss gewonnene Enzym liefert eine Grundlage für die Beschaffung von Protease für Wasch- und Reinigungsmittelsätze für einen viel niedrigeren Preis pro Einheit Enzymaktivität, als es bisher der Fall war. Ausserdem hat das erfindungsgemässe Enzym ein höheres optimales pH für die proteolytische Aktivität; nämlich pH 9,0-11,0 gegenüber einem optimalen pH-Bereich von pH 8,5-9,5 für ein handelsübliches Enzym, hergestellt aus Bacillus subtilis. Weiterhin entfernt das erfindungsgemässe Enzym/^{Flecken}mindestens ebenso gut und mitunter besser als die bisher marktgängigen Enzyme, und es hat eine grössere Lösungsstabilität im pH-Bereich von 9,5-11,0. In diesem pH-Bereich hat das erfindungsgemässe Enzym grössere caseinolytische Aktivität als das Enzym aus Bacillus subtilis. Beide Enzyme haben eine optimale Temperatur für caseinolytische Aktivität bei 55°C bei einem pH 7,0. In Gegenwart von Calciumionen verschiebt sich die optimale Temperatur auf 60°C.

Auch die Inaktivierung durch Erwärmung wurde ebenfalls verglichen. Beide Enzyme wurden bei verschiedenen Temperaturen während 15 Minuten bebrütet und dann rasch in Eiswasser abgekühlt. Die restliche Aktivität wurde mit Casein bei pH 9,5 geprüft. Bei Bruttemperaturen unter 40°C waren beide Enzyme beständig. Bei 60°C war das Enzym aus Bacillus subtilis vollständig inaktiviert, während das erfindungsgemässe Enzym 15% seiner ursprünglichen Aktivität bewahrte. Unter den gleichen Bedingungen bei 60°C aber bei zusätzlicher Anwesenheit von 10^{-4} Calciumionen behielt das erfindungsgemässe Enzym 30% seiner proteolytischen Aktivität, während das Enzym aus Bacillus subtilis nur 20% bewahrte.

Die Ausbeute an erfindungsgemäss erhaltener alkalischer Protease ist mindestens doppelt so hoch, wie sie bisher

aus einem Bacillus subtilis-Stamm, der hohe Ausbeuten liefert, erhalten wird.

Der erfindungsgemässe Bacillus licheniformis ATCC No.21424 ist gekennzeichnet durch folgende Reaktionen:

Gelatinehydrolyse - positiv

Stärkehydrolyse - positiv

Gärungsprüfungen:

Sukrose - Säureproduktion in 24 Stunden

Xylose - Säureproduktion in 72 Stunden

Arabinose - Säureproduktion in 72 Stunden

Salicin - Säureproduktion in 96 Stunden

Laktose - negativ

Glukosenitrat-Schrägagar - überreichliches Wachstum

Nitrite aus Nitraten - positiv

Sporangien - sehr geringes Quellen.

Die Zellen zeigten Beweglichkeit und Nichteinkapselung.

Alle diese Prüfungen sind typisch sowohl für Bacillus subtilis wie Bacillus licheniformis. Die folgenden zusätzlichen Prüfungen wurden ausgeführt, um die Klassifizierung als Bacillus licheniformis zu bestätigen.

Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen: Jeder der drei Organismen Bacillus subtilis ATCC No.15841, Bacillus licheniformis ATCC No.12759 und Bacillus licheniformis ATCC No.21424 wurden bebrütet unmittelbar aus der Schrägkultur in einem modifizierten Koser-Citratmedium während 10 Tagen bei 37°C. Sie wurden auf Trypticose-Soy-Schrägagar (BBL Labs) bei 4°C vor der Anwendung gehalten. Das Medium enthielt entweder 0,2% Natriumcitrat, Natriumacetat oder Natriumpropionat. Zusätzlich enthielt das Medium 1% NaCl, 0,1% (NH₄)₂HPO₄, 0,05% KH₂PO₄, 0,02% MgSO₄·7H₂O, 1,5% Agar und 0,0008% ~~rot~~ Phenol. Das Medium war auf ein pH 7,0 eingestellt. Am Ende der Brutperiode wurde das Wachstum durch Veränderungen in dem Farbindikator von gelb zu rot bewertet.

2048161

~~4~~
4

Bacillus licheniformis metabolisierte alle drei organischen Salze, während Bacillus subtilis nur das Citrat ausnutzte. Ausnutzung der Anionen durch die Organismen setzte Na⁺ in Freiheit, welches seinerseits das pH des Mediums steigerte und den Indikator von gelb zu rot veränderte. Daher ergab der Bacillus subtilis Rotfärbung auf der Citrat-Schräggkultur, aber keine Veränderung auf den Acetat- und Propionatmedien. Die anderen zwei Organismen lieferten Rotfärbungen auf allen Schräggkulturen.

Wachstum unter Anaerobiosis: Jede der drei eben erwähnten Organismen wurde ~~in~~ eingepflegt in rohrförmige Gefässe von Trypticase-Soy-Brühe mit einem Gehalt von 0,095% Thioglykolat und 0,005% Cystin. Zusätzlich wurden Stichkulturen aus jedem Organismus hergestellt unter Verwendung von anaerobischem Agar ohne Dextrose oder Eh. Indikator (BBL Labs). Dieses Agar enthielt 20 g Trypticase, ein Pepton, hergestellt aus Casein durch pankreatische Verdauung 5 g NaCl, 15g Agar, 2 g Natriumthioglykolat und 1 g Natriumformaldehydsulfoxylat pro Liter. Nach der Bebrütung während 10 Tagen bei 37°C wurden die Kulturen auf Wachstum beobachtet.

Unter diesen Bedingungen wuchs jeder Organismus in der Thioglykolatbrühe. Jedoch entfalteten die zwei Stämme Bacillus licheniformis mehr Wachstum nach 7 Tagen Bebrütung als der Bacillus subtilis. Ähnliche Beobachtungen wurden bei den Stichkulturprüfungen festgestellt. Ferner wiesen die Stämme von Bacillus licheniformis die Fähigkeit auf, in dem Boden der Stichkultur zu wachsen, während Wachstum nur auftrat in dem oberen Teil der Stichkultur von Bacillus subtilis. Dies zeigt an, dass die Bacillus licheniformis-Stämme fakultativ anaerobischer sind als der Bacillus subtilis.

Wachstum bei 56°C: Jeder der drei Mikroorganismen wurde geimpft auf Trypticase Soy-Schrägagar und bei 56°C während 18 Stunden bebrütet. Am Ende der Brutzeit wurden die Kulturen auf Wachstum beobachtet.

10981671635

BAD ORIGINAL

Unter diesen Bedingungen entfalteten die zwei Stämme von Bacillus licheniformis ATCC No. 12759 und ATCC No. 12424 übermässiges Wachstum, während kein Wachstum beobachtet wurde bei Bacillus subtilis, ATCC No. 15841.

Bei der Gewinnung von alkalischer Protease aus Bacillus licheniformis ATCC No. 21424 besteht das Kulturmedium aus Protein, vorzugsweise 1-4%, einer Kohlenstoffquelle, vorzugsweise 1-12% und solchen mineralischen Ergänzungsstoffen, wie sie notwendig sind, um richtiges Wachstum des Mikroorganismus zu sichern. Soyabohnenmehl ist ein bevorzugtes Proteinrohmaterial, aber auch andere Proteinsubstrate können benutzt werden, z.B. Casein, Pharmamedia, ein aus Baumwollsaat stammendes Proteinmaterial und Proflo, ein teilweise entfettetes Baumwollsaatmehl (beide geliefert von Traders Protein Div. of Traders Oil Mill Co., Fort Worth, Texas). Während Glukose als Kohlenstoffquelle bevorzugt wird, können auch Maismehl und Dextrin verwendet werden. Handelsübliche Produkte, z.B. Cerelese, eine Dextrose der Corn Products Company, mit einem hohen Glukosegehalt kann auch benutzt werden. Die Mineralsalze, welche als brauchbar bei den bevorzugten Kulturmedien gemäss der Erfindung gefunden wurden, schliessen $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCO_3$, $CaCl_2$, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 und $ZnCl_2$ ein.

Grösste Enzymgewinnung wird erhalten, wenn das Medium von Anfang an auf pH 7,6 gepuffert ist. Die Ausbeuten wurden allmählich weniger, wenn sich das pH in irgendeiner Richtung von diesem Wert verschiebt, und bei pH-Werten unter 7 oder über 8 wird die Ausbeute in unannehmbarer Weise niedrig.

Die Gärung des geimpften Kulturmediums wird voranschreiten gelassen, vorzugsweise während 48-96 Stunden bei einer Temperatur von 35-40°C, vorzugsweise bei etwa 37°C. Das Enzym wird aus der Lösung nach irgendeinem der hierfür üblichen Verfahren gewonnen.

Bei einem bevorzugten Verfahren für diese Gewinnung, welches eine hohe Ausbeute liefert, wird ein Calciumsalz, z.B. Calciumacetat, zu dem Kulturmedium zugesetzt. Unlösliche Calciumphosphate bilden sich, welche ihrerseits ein gelartiges Material absorbieren und beide werden durch Zentrifugieren, vorzugsweise bei etwa 4°C , entfernt. Die klare überstehende Flüssigkeit kann 98 % der gesamten ~~En~~ enzymatischen Aktivität in dem Kulturmedium enthalten.

Das Enzym kann aus der überstehenden Flüssigkeit durch Zusatz eines Drittel Volumens von Aceton bei 2°C zu dem klaren oben schwimmenden Bestandteil gewonnen werden. Der sich ergebende Niederschlag wird durch Zentrifugieren entfernt und verworfen. Weiteres Aceton wird zugesetzt, bis eine 75%ige Sättigung der Flüssigkeit erhalten ist. Die Suspension wird bei -20°C gelagert, bis die Fällung nach etwa 3 Stunden vollständig ist. Der Niederschlag wird gesammelt und getrocknet, um ein Pulver zu ergeben.

Die erfindungsgemässe alkalische Protease wird verwendet als aktiver Bestandteil in enzymhaltigen Wasch- und Reinigungsmitteln. Das Enzym kann in pulveriger oder flüssiger Form sich befinden und mit anderen Bestandteilen verdünnt werden. Es ist üblich, Enzympulver zu verdünnen, wie sie durch Gewinnung aus Gärungsverfahren erhalten werden, und zwar mit einem verträglichen Verdünnungsmittel, z.B. Natriumsulfat. Die erfindungsgemässe alkalische Protease wird in einem enzymhaltigen Detergensmittel in einer Menge zwischen 0,02 bis 0,1% des Pulvers angewendet. Wenn das Enzympulver auf etwa das fünffache mit Natriumsulfat verdünnt ist, hat es eine Aktivität von etwa 1300 proteolytischen Einheiten/mg.

Zusätzlich zu dem Enzym enthalten enzymhaltige Wasch- und Reinigungsmittel typischerweise aktive Detergentien. Verschiedene bekannte oberflächenaktive Agentien können als Aktivdetergentien gemäss der Erfindung verwendet werden, einschliesslich anionischer, nichtionischer, zwitterionischer, ampholytischer Detergensverbindungen und deren Gemische.

Anionische Detergentien, welche in den erfindungsgemässen Mitteln benutzt werden können, schliessen sowohl Seife wie nichtseifenartige Detergentien ein. Beispiele geeigneter Seifen sind die Natrium-, Kalium-, Ammonium- und Alkylol-ammoniumsalze höherer Fettsäuren ($C_{10}-C_{20}$). Die Natrium- oder Kaliumsalze der Mischungen von Fettsäuren aus Kokosöl und Talg, das ist eine Natrium- oder Kalium-Talg-Kokosöl-Seife, sind brauchbar. Beispiele anionischer organischer Nichtseifedetergensverbindungen sind die wasserlöslichen Alkalisalze von organischen Schwefelsäurereaktionsprodukten, welche in ihrer Molekularstruktur ein Alkylradikal mit einem Gehalt von etwa 8 bis etwa 22 Kohlenstoffatomen und ein Radikal, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Sulfonsäure- und Schwefelsäureesterradikalen, aufweisen. Eingeschlossen in dem Ausdruck Alkyl ist der Alkylteil höherer Acylradikale. Beispiele von synthetischen Detergentien, welche einen Teil der erfindungsgemässen Mittel bilden, sind die Natrium- oder Kaliumalkylsulfate, insbesondere solche, welche durch Sulfatieren der höheren Alkohole (C_8-C_{10} Kohlenstoffatome), hergestellt durch Reduzierung der Glyceride von Talg/ oder Kokosöl, erhalten werden, Natrium- oder Kaliumalkylbenzolsulfonate, wie sie in den USA-Patenten 2 220 009 und 2 477 383 beschrieben werden, worin die Alkylgruppe von etwa 9 bis etwa 15 Kohlenstoffatome enthält. Andere Beispiele von Alkalialkylbenzolsulfonaten sind diejenigen, worin das Alkylradikal ein geradkettiges Alkylradikal mit etwa 10 bis etwa 20 Kohlenstoffatomen ist, z.B. 2-Phenyldodecansulfonat und 3-Phenyldodecansulfonat; Natriumalkylglyceryläthersulfonat, insbesondere solche Äther höherer Alkohole, abgeleitet aus Talg und Kokosöl; Natriumkokosölfettsäuremonoglyceridsulfate und -sulfonate; Natrium- oder Kaliumsalze von Schwefelsäureestern des Reaktionsprodukts von 1 Mol eines höheren Fettalkohols (z.B. Talg- oder Kokosölalkohole) und etwa 1 bis 6 Mol Äthylenoxyd; Natrium- oder Kaliumsalze von Alkylphenoläthylenoxydäthersulfat mit etwa 1 bis etwa 10 Einheiten Äthylenoxyd pro Molekül und worin die Alkyl-

-8-

radikale etwa 9 bis etwa 12 Kohlenstoffatome enthalten; das Reaktionsprodukt von Fettsäuren, verestert mit Isäthionsäure und neutralisiert mit Natriumhydroxyd, worin beispielsweise die Fettsäuren aus Kokosöl stammen; Natrium- oder Kaliumsalze von Fettsäureamid eines Methyltaurids, worin die Fettsäuren beispielsweise aus Kokosöl stammen; und andere in der Technik bekannte Verbindungen, von welchen eine Anzahl in den USA-Patentschriften 2 486 921, 2 486 922 und 2 396 278 aufgezählt sind.

Nichtionische synthetische Detergentien können allgemein definiert werden als solche aliphatischen oder alkylaromatischen Verbindungen, welche in wässriger Lösung nicht ionisieren. Beispielsweise ist eine wohlbekannte Klasse synthetischer Nonionics auf dem Markt unter dem Handelsnamen "Pluronic" erhältlich. Diese Verbindungen werden hergestellt durch Kondensieren von Äthylenoxyd mit einer hydrophoben Basis, welche selbst durch Kondensation von Propylenoxyd mit Propylenglykol erhalten wurde. Der hydrophobe Anteil des Moleküls, welcher naturgemäss wasserunlöslich ist, besitzt ein Molekulargewicht von etwa 1500 bis 1800. Die Addition von Polyoxyäthylenradikalen zu diesem hydrophoben Teil führt zu einer Steigerung der Wasserlöslichkeit des Moleküls als ganzes, und die flüssige Beschaffenheit des Produkts wird bis zu dem Punkt erhalten, bei welchem der Polyoxyäthylengehalt etwa 50% des Gesamtgewichts des Kondensationsproduktes beträgt.

Andere geeignete Nonionics schliessen ein:

1. Die Polyäthylenoxydkondensate von Alkylphenolen, das sind die Kondensationsprodukte von Alkylphenolen mit einer Alkylgruppe von etwa 6-12 Kohlenstoffatomen in entweder einer geraden oder verzweigten Kette und Äthylenoxyd, wobei das Äthylenoxyd in Mengen von etwa 10 bis 25 Molen Äthylenoxyd pro Mol Alkylphenol zugegen ist. Der Alkylsubstituent in solchen Verbindungen kann aus polymerisiertem Propylen, Diisobutylene, Octan oder Nonen beispielsweise abgeleitet ~~schon~~ sein.

109816/1835

ORIGINAL INSPECTED

2. Derivate, stammend aus der Kondensation von Äthylenoxyd mit dem Produkt, welches sich aus der Reaktion von Propylenoxyd und Äthylendiamin ergibt. Beispielsweise Verbindungen mit einem Gehalt von etwa 40% bis etwa 80 Gew.% Polyoxy-äthylen und deren Durchschnittsmolekulargewicht zwischen etwa 5000 und etwa 11000 liegt und sich aus der Reaktion von Äthylenoxydgruppen mit einer hydrophoben Basis ergeben, welche selbst aus dem Reaktionsprodukt von Äthylendiamin und überschüssigem Propylenoxyd stammt, wobei diese Basis ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 2500 bis 3000 besitzt, sind zufriedenstellend.

3. Das Kondensationsprodukt von aliphatischen Alkoholen mit 8-18 Kohlenstoffatomen, entweder in gerader oder verzweigter Kette, mit Äthylenoxyd, s.B. ein Kokosölalcohol-Äthylenoxyd-Kondensat mit 10-30 Molen Äthylenoxyd pro Mol Kokosölalkohol, wobei die Kokosölalkoholfraktion 10-14 Kohlenstoffatome besitzt.

4. Langkettige tertiäre Aminoxyde entsprechend der folgenden allgemeinen Formel $R_1R_2R_3N \rightarrow O$, worin R_1 ein Alkylradikal von etwa 8 bis 18 Kohlenstoffatomen und R_2 und R_3 entweder Methyl- oder Äthylradikale sind. Der Pfeil in der Formel ist eine übliche Darstellung einer halbpolaren Bindung. Beispiele von für die Erfindung geeigneten Aminoxyden sind Dimethyldodecylaminoxyd, Dimethyloctylaminoxyd, Dimethyldecylaminoxyd, Dimethyltetradecylaminoxyd, Dimethylhexadecylaminoxyd.

5. Langkettige, tertiäre Phosphinoxyde entsprechend der folgenden Formel $RR'R''P \rightarrow O$, worin R ein Alkyl-, Alkenyl- oder Monohydroxyalkylradikal ist mit einer Kettenlänge von 10 bis 18 Kohlenstoffatomen und R' und R'' Alkyl- oder Monohydroxyalkylgruppen mit einem Gehalt von 1 bis 3 Kohlenstoffatomen sind. Der Pfeil in der Formel ist eine übliche Darstellung einer halbpolaren Bindung. Beispiele geeigneter Phosphine sind:

Dimethyldodecylphosphinoxyd,
 Dimethyltetradecylphosphinoxyd,
 Äthylmethyldodecylphosphinoxyd,
 Octyldimethylphosphinoxyd,
 Dimethylstearylphosphinoxyd
 Cetyläthylpropylphosphinoxyd,
 Diäthylphosphinoxyd,
 Diäthyltetradecylphosphinoxyd,
 Bis(hydroxymethyl)dodecylphosphinoxyd,
 Bis(2-hydroxyäthyl)dodecylphosphinoxyd,
 2-Hydroxypropylmethyldodecylphosphinoxyd,
 Dimethylolethylphosphinoxyd und
 Dimethyl-2-hydroxydodecylphosphinoxyd.

6. Dialkylsulfoxyde entsprechenden der folgenden Formel
 $RR'S \rightarrow O$, worin R ein Alkyl-, Alkenyl-, beta- oder
 gamma-Monohydroxyalkylradikal mit einem oder zwei anderen
 Sauerstoffatomen in der Kette ist und die R-Gruppen eine
 Kettenlänge von 10 bis 18 Kohlenstoffatomen besitzen,
 und worin R' Methyl oder Äthyl~~er~~ ist. Beispiele geeigneter
 Sulfoxydverbindungen^{en} sind:

Dodecylmethyldisulfoxid,
 Tetradecylmethyldisulfoxid,
 3-Hydroxytridecylmethyldisulfoxid,
 2-Hydroxydodecylmethyldisulfoxid,
 3-Hydroxy-4-decoxybutylmethyldisulfoxid,
 3-Hydroxy-4-dodecoxybutylmethyldisulfoxid,
 2-Hydroxy-3-decoxypropylmethyldisulfoxid,
 2-Hydroxy-3-dodecoxypropylmethyldisulfoxid,
 Dodecyläthylsulfoxid und
 2-Hydroxydodecyläthylsulfoxid.

Das 3-Hydroxy-4-decoxybutylmethyldisulfoxid wurde als ein
 ganz besonders wirksames Tensid gefunden. Ein hervorragendes
 Wasch- und Reinigungsmittel enthält diese Sulfoxydver-
 bindung in Kombination mit dem Polymaleatgerüststoff der
 erfindungsgemässen Verbindung.

Ampholytische synthetische Detergentien können allgemein bezeichnet werden als Derivate aliphatischer sekundärer und tertiärer Amine, worin das aliphatische Radikal eine gerade oder verzweigte Kette sein kann, in welcher einer der aliphatischen Substituenten etwa 8 bis 18 Kohlenstoffatome und einer eine anionische wasserlöslichmachende Gruppe enthält. Beispiele von unter diese Definition fallenden Verbindungen sind Natrium-3-dodecylaminopropionat und Natrium-3-dodecylaminopropansulfonat.

Zwitterionische synthetische Detergentien können im allgemeinen bezeichnet werden als Derivate von aliphatischen quaternären Ammoniumverbindungen, worin das aliphatische Radikal geradekettig oder verzweigt-kettig sein kann und einer der aliphatischen Substituenten von etwa 8 bis 18 Kohlenstoffatomen und einer eine anionische wasserlöslichmachende Gruppe enthält. Beispiele von unter diese Definition fallenden Verbindungen sind 3-(N,N-dimethyl-N-hexadecylammonio)-propan-1-sulfonat und 3-(N,N-dimethyl-N-hexadecylammonio)-2-hydroxypropan-1-sulfonat, welche insbesondere wegen ihres ausgezeichneten Reinigungsvermögens in kaltem Wasser bevorzugt werden.

Die im vorstehenden erwähnten anionischen, nichtionischen, ampholytischen und zwitterionischen Tenside können einzeln oder in Kombination in der erfindungsgemässen Praxis angewendet werden. Die obigen Beispiele sind nur eine Erläuterung für die zahlreichen Tenside, welche innerhalb des Bereichs der Erfindung benutzt werden können.

Die erwähnten organischen Tenside können in eine beliebige der verschiedenen handelsüblichen erwünschten Formen für Wasch- und Reinigungsmittel eingebracht werden, z.B. in die Form von Granulaten, Flocken, Flüssigkeiten und Stücken.

Diese Mittel können auch wahlweise entweder organische oder anorganische Gerüststoffe enthalten, z.B. Natriumtripolyphosphat, Tetranatriumpyrophosphat, Tetrakaliumpyrophosphat, Kaliumtripolyphosphat, Natriumhexametaphosphat,

-12-

Natriumnitrilotriacetat und das Natriumsalz von Äthylen-diamintetraessigsäure.

Es muss mit Sorgfalt darauf geachtet werden, sicherzustellen, dass die erfindungsgemässen Mittel keine Agentien enthalten, welche in ungünstiger Weise die Enzymkomposition beeinträchtigen oder von ihr beeinträchtigt werden. Beispielsweise dürfen keine Hypochloridbleichmittel verwendet werden, weil sie das Enzym vollständig inaktivieren. Auch die sogenannten Sauerstoffbleichmittel können eine ungünstige Wirkung entfalten. Ferner sollten im allgemeinen andere Proteine und proteinartige Stoffe zu den erfindungsgemässen Mitteln nicht zugesetzt werden, da sie durch die erfindungsgemässe alkalische Protease angegriffen werden können.

Die Erfindung wird noch an den folgenden Beispielen erläutert.

Beispiel 1

Ein Medium aus 6% Glukose, 2% Soyabohnenmehl, 0,04% CaCl_2 , 0,02% MgCl_2 in 0,1 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , gepuffert auf pH 7,6, wurde zubereitet. Die Glukose wurde als eine 50%ige, separat autoklavierte Lösung vorbereitet. Der Rest des Mediums wurde ebenfalls separat autoklaviert und die zwei Anteile wurden unter aseptischen Bedingungen vereinigt.

Ein Impfstoff wurde vorbereitet durch Zusatz von 5 ml sterilem destilliertem Wasser zu einer 24 Stunden alten Trypticase Soy-Schräggkultur von Bacillus licheniformis, ATCC No.21424 (Trypticase Soy Agar (BBL) hat die folgende Zusammensetzung: Trypticase, ein Pepton, abgeleitet aus Casein durch pankreatische Verdauung, 15 g; Phyton, ein Papiaverdauungsprodukt von Soyamehl, 5 g; NaCl 5 g und Agar 15 g in 1 Liter Wasser) welche 24 Stunden bei 37°C bebrütet worden war. Eine Zellsuspension wurde hergestellt. Die Suspension wurde dann aseptisch eingeführt in einen 250 ml Erlenmeyer-Kolben, welcher 50 ml des oben beschriebenen autoklavierten Mediums enthielt. Der Kolben wurde dann auf einer hin- und hergehenden Schüttelmaschine mit 175 Umdrehungen pro Minute während 18 Stunden bei 37°C

109818/1985

-12- 13

geschüttelt. Nach dieser Bebrütungszeit wurden 10% Impfmateri-
 al (5 ml) aus dem Impfstoffmedium vom Erlenmeyer-Kolben
 in jeden aus einer Reihe von Gärungskolben eingebracht,
 von welchen jeder 50 ml des oben beschriebenen autoklavier-
 ten Mediums enthielt.

Die Reihe der Gärungskolben wurde ~~xxx~~ auf einer hin- und
 hergehenden Schüttelmaschine mit 175 Umdrehungen pro Minute
 bei 37°C geschüttelt. Die maximale Proteaseerzeugung darin
 trat nach 48-72 Stunden oder bei einem End-pH von 7,2-7,4
 auf.

~~Winn~~ Gewinnung des Enzyms wird nach Beendigung der Gärungs-
 zeit durch Zusatz einer 0,15 %igen wässrigen Lösung von
 Calciumacetat zu dem Kulturmedium bewirkt. Der Calciumsalz-
 zusatz verursachte die Bildung von unlöslichen Calciumphospha-
 ten, welche ihrerseits eine gelartige Substanz in dem Medium
 absorbierten. Die unlöslichen Verbindungen wurden dann aus
 dem Medium durch Zentrifugieren bei 4°C entfernt. Die klare
 überschwimmende Flüssigkeit enthielt annähernd 98% der
 gesamten in dem Kulturmedium vorhandenen Enzymaktivität.

Zusätzliche Reinigung wurde ausgeführt x durch Zusatz
 von einem Drittel Volumen Aceton (25% Sättigung) zu der
 klaren überschwimmenden Flüssigkeit bei 2°C. Der sich bildende
 Niederschlag wurde dann durch Zentrifugieren entfernt und
 verworfen. Weiteres Aceton wurde zugesetzt, bis 75% Sättigung
 erhalten war. Die anfallende Suspension wurde bei -20°C
 für annähernd drei Stunden gelagert, bis Fällung vollständig
 war. Der Niederschlag wurde gesammelt und anschliessend ge-
 trocknet entweder durch Acetontrocknung oder Gefriertrocknung.
 Die Ausbeuten lagen im Bereich von 800 bis 1100 mg getrock-
 netes Enzympulver pro Liter klarer überschwimmender Flüssig-
 keit.

Die Stärke der Enzymzubereitungen wurde bestimmt durch die
 folgende auf der Verdauung von Casein beruhende Prüfung.

Prüfung.

1,9 ml von 0,05 M Na-Borat - 1,0 N NaOH-Puffer (pH 9,5)
 werden zugesetzt zu 1,0 ml 2%iger Casein(Hammersten)-Lösung,

-15- 14

hergestellt mit dem gleichen Boratpuffer, und bei 37°C ins Gleichgewicht gebracht. Dann werden zugesetzt 0,1 ml des Enzymmusters in geeigneter Verdünnung zu dem Casein-Puffer-Gemisch. Nach 10 Minuten Verdauung bei 37°C wurden 3,0 ml 10%iger Trichloressigsäure zugegeben und die Bebrütung wurde bei 37°C für weitere 30 Minuten fortgesetzt, um völlige Ausfällung des unverdauten Caseins zu sichern. Der Niederschlag wurde durch Filtrieren entfernt (Whatman-Papier Nr.2) und das Absorptionsvermögen ~~xxx~~ des klaren Filtrats wurde in einem Spektrophotometer bei 280 μ gegenüber einem Nullversuch abgelesen. Der Nullversuch wurde in ähnlicher Weise vorbereitet mit der Abänderung, dass 3,0 ml von 10%iger Trichloressigsäure zuerst zu dem Casein-1,9 ml-Puffergemisch zugesetzt und das Enzymmuster (0,1 ml) anschliessend zugegeben wurde. Eine proteolytische Einheit, wie der Ausdruck hier und in den Ansprüchen verwendet wird, ist willkürlich definiert als die Menge an Enzym, welche eine Steigerung im Absorptionsvermögen (optische Dichte) von 1,0 bei 280 μ in 10 Minuten bei 37°C hervorruft. 888 proteolytische Einheiten gemäss der Erfindung entsprechen einer Anson-Einheit.

Beispiele II-VII.

Die Mengen an Sojabohnenmehl und Glukose wurden verändert, wie in der folgenden Tabelle 1 angegeben, in einem sonst konstanten Medium, welches 0,04% CaCl_2 und 0,02% MgCl_2 in 0,1 ^M ~~100g~~ Phosphatpuffer bei pH 7,6 enthielt. Die Versuche wurden in einem Schüttelkolben mit 175 Umdrehungen pro Minute bei 37°C durchgeführt. Die Gärungen wurden fortgesetzt, bis der Höchstgrad an Enzymerzeugung erreicht war. Die Ergebnisse dieser Untersuchung folgen in Tabelle 1.

ORIGINAL INSPECTED

Tabelle 1

Proteaseerzeugung mit verschiedenen Konzentrationen von
Sojabohnenmehl und Glukose

Beispiel Nr.	II	III	IV	V	VI	VII
<u>Medien</u>						
Sojabohnenmehl (%)	1	1	1	1	2	4
Glukose (%)	1	2	3	4	6	12
<u>mg Stickstoff/ ml Medium</u>						
Sojabohnenmehl	0,65	0,65	0,65	0,65	1,30	2,60
<u>Gesamte reduzie- rende Zucker AS mg Glukose/ml Medium</u>						
Sojabohnenmehl	0,27	0,27	0,27	0,27	0,54	1,08
Glukose	10	20	30	40	60	120
<u>Kohlenstoff: Stickstoff-Ver- hältnis</u>	6,2	12,3	18,5	24,6	18,6	18,6
<u>Proteolytische Einheiten/ ml Medium bei Höchst- produktion</u>	18	22	27	27	80	60

Beispiel VIII

Ein Medium, umfassend 3% Glukose, 1% Sojabohnenmehl, 0,04% CaCl_2 , 0,2% MgCl_2 in 0,1 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 Puffer mit pH 7,6 wurde zubereitet. Eine Impfung wurde ausgeführt wie in Beispiel 1 beschrieben aus einer 24 Stunden alten Trypticase Soy Agar Schrägkultur von Bacillus licheniformis ATTC Nr. 21424. 100 ml der Impfung wurden in einen Liter des oben beschriebenen Mediums eingeführt, und der Kolben wurde in einem hin- und hergehenden Schüttler mit 175 Umdrehungen pro Minute und bei 37°C geschüttelt. Jeweilige Muster wurden aus dem Kolben nach 24, 48 und 72 Stunden genommen und die gesamte bakterielle Zählung, die Sporenzählung und die Aktivität des Protease-enzym in dem Muster wurden bestimmt nach jedem dieser Zeitabläufe. Die Aktivität wurde bestimmt in Glycineinheiten(GU)

109816/1235

-15-16

pro ml oder pro mg. Zu Vergleichszwecken mit den oben erwähnten proteolytischen Einheiten ist zu sagen, dass eine proteolytische Einheit 846 Glycineinheiten gleichkommt. Die Ergebnisse der Bestimmungen folgen in Tabelle 2.

Tabelle 2

Stammkulturen

Zeit (Stunden)	Gesamte Bakterielle Zählung	Sporenzählung	Aktivität(GU/ml)
0	58×10^5	-	-
24	25×10^8	54×10^7	13.800
48	104×10^8	37×10^8	20.700
72	98×10^8	49×10^8	18.800

Die höchste Bakterienzahl wurde nach 48 Stunden erhalten, und es scheint eine 50%ige Sporulation nach 72 Stunden vorhanden zu sein. Die proteolytische Aktivität erreichte ein Maximum von 20.700 GU/ml nach 48 Stunden. Dies stellt eine ausgezeichnete Ausbeute dar. Ein eine hohe Ausbeute ergebender Stamm von Bacillus subtilis liefert ein Maximum von 13.000 GU/ml nach 40 Stunden unter Verwendung der gleichen Bedingungen.

Das Enzym wurde isoliert aus dem Kulturmedium nach der angegebenen Bebrütungszeit durch Abkühlen der Flüssigkeit auf 5°C und Abschleudern bei 17.300 x g-350 ml/Minute in einer gekühlten Sorvall-Zentrifuge RC 2 B, ausgerüstet mit einem Szent Gyorgyi kontinuierlichem Fließsystem. Das Medium wurde dann vermischt mit 2 Volumen Aceton (-20°C), und nach einer Stunde wurde das Präzipitat zentrifugiert (6780 x g - 350 ml/Minute). Das Präzipitat wurde wiederum in etwa 300 ml einer Wasser-Aceton-Mischung (1 Volumen/2 Volumen)suspendiert. Der Brei wurde auf einem Büchner-Trichter filtriert und das Präzipitat durch Zusatz von mehr kaltem Aceton getrocknet.

Die Ergebnisse, erhalten während der Isolierung der Proteasen aus fünf von den 1 Liter Kolben, folgen in Tabelle 3.

-76- 17

Tabelle 3

Mediumvolumen(1)	5
Aktivität vor Aufarbeitung(GU/ml)	17,300
Ernte (g)	104
Pulveraktivität(GU/ml)	675
Ausbeute in % der anfänglichen Aktivität	82%.

Die Verluste während der Aufarbeitung sind sehr gering. Die Ausbeute von 82% ist vergleichsweise günstig gegenüber einer üblichen Ausbeute von 50% bei den meisten Stämmen von Bacillus subtilis.

Beispiel 9 IX

Die Enzymzubereitung, hergestellt gemäss Beispiel 1, wird als aktiver Bestandteil in Wasch- und Reinigungsmitteln folgender Zusammenstellung verwendet:

	%
Natriumalkylarylsulfonat	8,2
Natriumfettalkoholsulfat	8,2
C ₁₂ Fettsäureamid	1,5
Alkalische Protease; getrocknetes Enzym- pulver, hergestellt nach dem Verfahren von Beispiel 1, fünffach mit Natriumsulfat verdünnt	0,2
Natriumtripolyphosphat	50
Natriumsilikat	4,8
Natriumsulfat	13,4
Parfüm	0,15
Verschiedenes	2,1
Wasser	Rest

Beispiel X

Die Protease, zubereitet nach Beispiel VIII, wird als aktiver Bestandteil in einem Detergensmittel gemäss nachstehender Zusammensetzung verwendet:

-19- 18

C ₁₂₋₁₄ Fettalkohol 10. AO Kondensat	<u>2,7</u>
Natriumalkylarylsulfonat	12,6
Natriumseife	1,4
Alkalische Protease; getrocknetes Enzym- pulver, hergestellt nach dem Verfahren von Beispiel VIII, fünffach mit Natrium- sulfat verdünnt	0,5
Natriumtripolyphosphat	50,0
Natriumsilicat	4,5
Natriumsulfat	13,0
Wasser	13,5
Parfüm	0,1
Verschiedenes	1,7

-19-

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Gewinnung alkalischer Protease durch Impfung eines Kulturmediums mit Bacillus licheniformis, Gärung und Gewinnung der alkalischen Protease, dadurch gekennzeichnet, dass als Bacillus der Bacillus licheniformis ATCC No.21424 verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kulturmedium ein pH von 7-8 besitzt und ~~ein~~ Protein, eine Kohlenstoffquelle und ein Mineralsalz umfasst.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium 1-4% Protein und 1-12% Kohlenstoffquelle umfasst, wobei die Prozentsätze auf das Gewicht des Mediums bezogen sind.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein Sojabohnenmehl ist.
5. Verfahren nach Anspruch 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Kohlenstoffquelle Glukose, Maismehl oder Dextrin ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-5, dadurch gekennzeichnet, dass das Mineralsalz ein Chlorid von Mangan, Magnesium, Zink und/oder Calcium ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass das Kulturmedium ~~ein~~ ein pH von 7,6 besitzt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Gärung des geimpften Kulturmediums während 48-96 Stunden bei 35-40°C durchgeführt wird.
- ~~9. Wasch- und Reinigungsmittel, enthaltend eine alkalische Protease und ein Aktivdetergens, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease aus Bacillus licheniformis ATCC No.21424 erhalten ist.~~
- ~~10. Wasch- und Reinigungsmittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease in einer Menge von 0,02-0,1% vom Gewicht des Mittels anwesend ist.~~